

AB

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-282001

(43) 公開日 平成10年(1998)10月23日

(51) Int.Cl.⁸
 G 0 1 N 21/76
 21/78
 33/52

識別記号

F I
 G 0 1 N 21/76
 21/78 C
 33/52 Z

審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 6 頁)

(21) 出願番号 特願平9-83887

(22) 出願日 平成9年(1997)4月2日

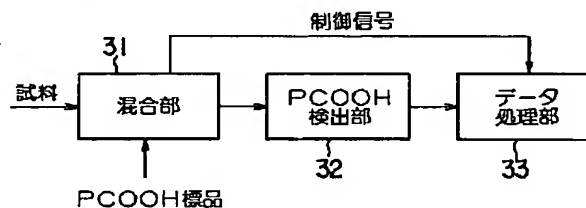
(71) 出願人 000222026
 東北電子産業株式会社
 宮城県仙台市太白区向山2丁目36番4号
 (72) 発明者 佐伯 昭雄
 宮城県仙台市太白区向山3-9-2
 (72) 発明者 宮澤 陽夫
 宮城県仙台市泉区高森7-17-7
 (72) 発明者 宇佐 史
 宮城県黒川郡富谷町一ノ関字川又山2-172
 (72) 発明者 山田 理恵
 宮城県仙台市太白区向山3-11-30-205
 (74) 代理人 弁理士 鈴江 武彦 (外5名)

(54) 【発明の名称】 液体試料の抗酸化力を測定するための方法および装置

(57) 【要約】

【課題】 生体内に存在する全ての抗酸化物質の総体としての抗酸化力を測定することができる方法と、この方法を容易に実施するための装置とを提供すること。

【解決手段】 液体試料の抗酸化力を測定するための方法であって：該液体試料に対して所定量の過酸化物を添加混合する工程と；所定時間経過後に、前記液体試料の中に残存している前記過酸化物の量を測定する工程と；前記所定時間の間に減少した前記過酸化物の量に基づいて、前記液体試料の抗酸化力指標を算出する工程とを具備した方法。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 液体試料の抗酸化力を測定するための方法であって：該液体試料に対して所定量の過酸化物を添加混合する工程と；所定時間経過後に、前記液体試料の中に残存している前記過酸化物の量を測定する工程と；前記所定時間の間に減少した前記過酸化物の量に基づいて、前記液体試料の抗酸化力指標を算出する工程とを具備した方法。

【請求項2】 請求項1に記載の方法であって、前記液体試料が生物体の体液であり、前記過酸化物が過酸化リン脂質である方法。

【請求項3】 請求項2に記載の方法であって、前記液体試料がヒトの血液であり、前記過酸化リン脂質がホスファチジルコリンハイドロパーオキサイドである方法。

【請求項4】 液体試料の抗酸化力を測定するための装置であって：抗酸化力を測定すべき試料に対して所定量の過酸化物を添加混合するための混合部と；該混合部で過酸化物を添加された試料に含まれる過酸化物濃度を検出するための検出部と；該検出部で得られた検出結果をデータ処理して、前記混合部で添加された過酸化物の残存量を算出するためのデータ処理部とを具備し、上記混合部は、試料のみを検出部に送るモードと、試料に過酸化物を添加した後に該混合物を検出部に送るモードの二つのモードの間で切り替えられるようになっており、上記の検出部は、混合部から供給される試料を個々の成分に分離するための液体クロマトグラフィーと；この液体クロマトグラフィーにより分離された成分に対して、過酸化物と反応して発光する発光試薬を混入するための試薬混入手段と；この発光試薬の反応によって生じた光を検出するための光検出手段とを具備しており、前記データ処理部は、前記混合部で過酸化物を添加しない場合の前記検出部での検出結果と、前記混合部で過酸化物を添加した場合の前記検出部での検出結果から、混合部で添加された過酸化物の所定時間経過後の回収率を算出する装置。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

【発明の属する技術分野】本発明は、物質の抗酸化力を測定するための方法および装置に関する。より詳しくは、生体、特に血液のトータルな抗酸化力を測定するための方法と、この方法を実施するための装置に関する。

【0002】

【従来の技術】活性酸素が各種細胞成分を無差別に酸化し、各種の酸素障害を生じることが明らかになって以来、健康を維持する上で、生体の抗酸化力の重要性に関する認識が高まっている。

【0003】生体の抗酸化力を調べる方法としては、従来、血液や組織中の個々の抗酸化物質を直接定量する方法が一般に用いられている。生体内の抗酸化物質として

は、SOD (superoxide dismutase)、カタラーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼ、ビタミンE、アスコルビン酸 (ビタミンC)、ビリルビン、 β -カロチン等がある。従って、血液等の生体組織におけるこれら個々の成分の活性または存在量を調べることにより、生体の抗酸化力が測定されている。

【0004】しかし、上記従来の方法では、血液等の体液または各組織中の個々の抗酸化物質に由来する抗酸化力を知ることはできるが、個体としてのトータルな抗酸化力を知ることはできない。何故なら、生体内における抗酸化機構は複雑であり、複数の抗酸化物質による相乗効果も大きいので、何れの抗酸化物質がどの程度実際に抗酸化効果を発揮しているのかを把握することは困難である。従って、上記従来の方法を用いて個々の抗酸化物質の活性または存在量を独立に測定し、これらを加算したとしても、生物個体のトータルの抗酸化力を知ることはできない。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明は上記事情に鑑みてなされたもので、生体内の個々の抗酸化物質の活性を独立して測定するのではなく、生体内に存在する全ての抗酸化物質の総体としての抗酸化力を測定することができると、この方法を容易に実施するための装置とを提供しようとするものである。

【0006】また、本発明は血液等の体液に限らず、如何なる液体試料についても適用可能で、その抗酸化力を測定することができる方法および装置を提供しようとするものである。

【0007】

【課題を解決するための手段】上記の課題は、液体試料の抗酸化力を測定するための方法であって：該液体試料に対して所定量の過酸化物を添加混合する工程と；所定時間経過後に、前記液体試料の中に残存している前記過酸化物の量を測定する工程と；前記所定時間の間に減少した前記過酸化物の量に基づいて、前記液体試料の抗酸化力指標を算出する工程とを具備した方法によって達成される。

【0008】本発明の方法において、前記液体試料は特に限定されないが、好ましくは生物体の体液、更に好ましくは血液である。これらの体液は、必要に応じて溶媒抽出を行い、得られた液体を試料に用いてもよい。また、生物組織をホモジェナイズし、溶媒抽出を行って得た液体試料を用いてもよい。更に、食品や高分子材料についても、液体状のこれら食品や高分子材料自体、並びに同様の抽出処理を行って得た液体を試料に用いることにより、その抗酸化力を測定することができる。

【0009】本発明においては、外部から試料に添加される前記過酸化物も特に限定されず、過酸化水素、各種の有機ヒドロペルオキシド等の各種の過酸化物を用いることができる。しかし、血液等の体液を試料とするとき

は、好ましくは過酸化リン脂質、より好ましくはホスファチジルコリンヒドロパーオキシド(PCOOH)である。

【0010】前記試料中に残存している過酸化物を検出する方法としては、例えば、試料を液体クロマトグラフィーによって個々の成分に分離し、分離された過酸化物を発光試薬と反応させ、これにより生じた光を光学的に検出することによって行うことができる。

【0011】本発明の方法において、外部から試料に添加された各種過酸化物は、試料がもっている総体的な抗酸化力によって分解されるから、その減少量または減少速度は、試料がもっているトータルな抗酸化力を直接反映している。従って、この減少量または減少速度を測定すれば、その結果に基づいて、その試料がもっているトータルな抗酸化力を知ることができる。

【0012】本発明の方法において、例えば外部から添加する過酸化物としてPCOOHを用い、血液の抗酸化力を測定する場合を想定すると、血液にはもともと或る量のPCOOHが含まれている。従って、本発明の方法により血液の抗酸化力を測定するためには、外部から添加するPCOOHの量は予め既知としても、血液にもともと含まれているPCOOHの量と、外部からPCOOHを添加した所定時間後に試料中に残存するPCOOHの量の両者を測定しなければならない。

【0013】そこで、本発明の装置では、一つの装置を用いて、このような二つの測定を行える構成とした。即ち、本発明による抗酸化力測定装置は、抗酸化力を測定すべき試料に対して所定量の過酸化物を添加混合するための混合部と；該混合部で過酸化物を添加された試料に含まれる過酸化物濃度を検出するための検出部と；該検出部で得られた検出結果をデータ処理して、前記混合部で添加された過酸化物の残存量を算出するためのデータ処理部とを具備する。

【0014】上記混合部は、試料のみを検出部に送るモードと、試料に過酸化物を添加した後に該混合物を検出部に送るモードの二つのモードの間で切り替えられるようになっている。また、上記の検出部は、混合部から供給される試料を個々の成分に分離するための液体クロマトグラフィーと；この液体クロマトグラフィーにより分離された成分に対して、過酸化物と反応して発光する発光試薬を混入するための試薬混入手段と；この発光試薬の反応によって生じた光を検出するための光検出手段とを具備している。更に、前記データ処理部は、混合部で過酸化物を添加しない場合の検出部での検出結果と、混合部で過酸化物を添加した場合の検出部での結果から、混合部で添加された過酸化物の所定時間経過後の回収率を算出するようになっている。

【0015】

【実施例】以下、図面を参照して本発明の実施例を説明する。まず、本発明による測定装置の心臓部である、試

料中の過酸化物濃度を検出するための検出部について説明する。図1は、本発明による装置における検出部の一実施例を示している。同図において、高速液体クロマトグラフィーHPLCは、溶剤容器1から溶出溶剤を送出する液送ポンプ2と、該ポンプにより送出された溶出溶剤の中に試料3を注入するインジェクター4と、試料を混入した溶出溶剤が送り込まれるカラム5とから構成されている。該カラム5の溶出部には、カラム5に充填された吸着剤の吸着能に応じて溶出されてくる各種成分の紫外吸収を検出するための、紫外吸収検出器6が設けられている。この紫外吸収検出器6を通った各成分には、液送ポンプ7によって発光試薬および増感剤8が注入される。この発光試薬および増感剤8が注入された夫々の成分はフローセル9に導かれる。このフローセル9に対向して、例えば単一光電子計数方式による微弱光検出器10の光電子倍增管が設けられている。この微弱光検出器10によって、フローセル9内を通過する各成分から発生される光が検出される。微弱光検出器10および紫外吸収検出器6の検出結果は、例えばペンレコーダからなる記録器11によって記録されるようになっている。

【0016】前記フローセル9は、内容量約100 μ l程度のものであり、例えば石英ガラス管または透明なテフロンチューブなどによって構成されている。図2および図3は夫々フローセル9の構成を示しており、図2はチューブ20を直線状としたもの、図3はチューブ20を渦巻状としたものである。チューブを直線状とした図2のフローセルは、検出感度は低い、ピークの分離能が良好である。これとは逆に、チューブを渦巻状としたフローセルは、検出感度は良好であるが、ピークの分解能が低い。

【0017】前記高速液体クロマトグラフィーHPLCにおけるカラム5としては、化学結合型シリカゲル、親水性ポリマーゲル、シリカゲル、多糖系ゲル、ポリスチレンゲル、ポリスチレンゲル誘導体、多糖系ゲル誘導体などを充填剤としたものが用いられ、好適には、オクタデシルシラン処理したODS系の逆相カラム、或いは順相系のシリカゲルカラムが使用される。

【0018】上記の検出部は、本件出願人による特公昭63-233374号の明細書に記載されているものであり、この装置を用いることにより、リン脂質過酸化物を高感度で検出することができる。

【0019】本発明の好ましい実施例では、上記の検出部で得られた結果から、後述する過酸化物の添加回収率および抗酸化力を求める。これを自動的に計測できるようにするために、図4の構成を採用した。同図において、31は混合部であり、試料である血漿に対して既知量の過酸化物を添加混合する部分である。この混合部は、過酸化物を添加するモードと添加しないモードとを切り替えられるようになっている。従って、血漿自体の過酸化物量(A)と、外部から過酸化物を添加した一定

時間後の過酸化物質(B)の両方を測定することができる。混合部31の下流には、図1の検出部32が設けられている。この検出部32は、図1で説明した測定装置と、混合部31から送られてくる試料を必要に応じて後述のように前処理し、図1の測定装置のインジェクター4に供給する装置とからなっている。検出部32で得られた検出出力は、データ処理部33に導かれる。このデータ処理部33では、例えば後述するような所定の式に従って添加回収率および抗酸化力を算出するようになっている。

【0020】次に、上記装置を用いた本発明による抗酸化力測定方法の実施例を説明する。測定試料としては、生体試料のなかでも、生体全体の状態を反映し易いと思われる血漿を用いた。この血漿の中に、リン脂質過酸化物の一つであるホスファチジルコリンハイドロパーオキシド(以下、PCOOHと略す)を添加し、その所定時間後に、このPCOOHの分解率を測定する。この方法によって、試料に用いた血漿がどの程度の抗酸化力、即ち過酸化物を消去する能力を有しているかを判定した。この外部から添加するPCOOHとしては、日本油脂株式会社製の卵黄由来PCOOH(NC10S)を用いた。

【0021】なお、上記の分解率は、一定量添加されたPCOOHが一定時間後にどれだけ回収されるか(添加回収率)を測定することにより行った。即ち、添加回収率および抗酸化力は、次式によって算出した。

【0022】

$$\text{添加回収率}(\%) = B / (A + C) \times 100$$

$$\text{抗酸化力} = 1 / \text{添加回収率}$$

但し、

A; PCOOHを外部から添加しないときの、血漿中に含まれるPCOOHの量

B; PCOOHを外部から添加した後、一定時間後に血漿中に含まれるPCOOHの量

C; 外部から添加したPCOOHの量である。

【0023】なお、図1の装置で説明したカラム溶出溶剤、送液ポンプ2、カラム5、紫外線吸収検出器、発光試薬、ポンプ7、発光検出器、記録器11としては次のものを用いた。

【0024】

カラム溶出溶剤: 2-プロパノール: メタノール: 蒸留水

(390:135:75 (v/v); 流量 1.0 ml/min)

カラム溶出溶剤用送液ポンプ2: 日本分光社製 PU-980

カラム5: 日本分光社製 SIL-NH₂カラム

紫外線吸収検出器: 日本分光社製 UV-970

発光試薬: チトクロームC (1 μg/ml) およびルミノール (10 μg/ml) を溶解した硼酸緩衝液 (50mM, pH10)

発光試薬用液送ポンプ7: 日本分光社製 PU-980

発光検出器: 東北電子産業社製化学発光検出器

記録器11: SIC(東京インストルメント株式会社)製クロマトコーダー-12

使用血漿: 0.4 ml

外部添加PCOOH: 日本油脂株式会社製の卵黄由来PCOOH(NC10S)

具体的な測定手順は次の通りである。

【0025】まず、次のような前処理を行なう。即ち、血漿にクロロホルム: メタノール(1:2)を添加して攪拌する。遠心分離を行った後に上層を採取し、クロロホルムおよび蒸留水を添加する。これを攪拌および遠心分離した後、得られた下層(クロロホルム層)を脂質抽出サンプルとして使用する。こうして得られた脂質抽出サンプルは、図1で説明した試料3として、インジェクター4により注入される。なお、この前処理を自動的に行うための装置を、図1の装置のインジェクター4に接続して用いるのが好まし。この場合、この前処理装置は図4の混合部31に接続される。

【0026】添加回収率を求める場合には、混合部31において血漿に予め既知濃度のPCOOHを添加した場合と、これを添加しなかった場合の両者について、上記と同様に脂質抽出を行った後にPCOOH量の分析を行う。これによって、既述したPCOOHの量(A)および(B)が測定される。従って、これらの値(A)および(B)を、予め既知の外部から添加したPCOOHの量(C)と共に図4のデータ処理部33に入力することにより、既述の式に従って添加回収率および抗酸化力が算出される。

【0027】上記実施例の分析方法は、PCOOHのみを特異的に検出するものである。この方法により、正常時のPCOOHの濃度が異なることが知られている6人の患者から得た血漿について、上記の方法によりPCOOHの添加回収率および各血漿サンプルの抗酸化力を測定した。なお、一般に、通常の状態でのPCOOH含量が低い血漿ほど抗酸化力が高く、逆に通常の状態でのPCOOH含量が高い血漿は抗酸化力が低いことが認められている。

【0028】上記による分析の結果を図5に示す。同図において、横軸(y)は混合部31でPCOOHを添加しなかったときの各血漿サンプルのPCOOH濃度を示している。縦軸(x)は、上記で定義した添加回収率(%)および抗酸化力の値を示している。図から明らかに、両者の間には $y = 0.3462x + 9.7971$ で示される関係がある。この結果は、正常時における血漿中のPCOOH濃度と、該血漿の抗酸化力が逆比例するとの医学界の定説に一致している。また、その相関係数は $R^2 = 0.81$ であり、両者の間には良好な相関関係があることがわかった。従って、上記の結果は、本願発明による方法が試料の有しているトータルな抗酸化力を測定する上

で極めて有用であることを示している。

【0029】上記実施例から明かなように、本発明によれば、PCOOHを低減するための生物個体のトータルな抗酸化力の判定が可能である。このことは非常に重要な意味を有する。即ち、血漿中の脂質は種々の要因によって酸化を受け、それが老化および各種疾病を引き起こすことが知られているが、とりわけリン脂質は機能性脂質として生体内でも重要な働きを有しており、その酸化により生成するリン脂質過酸化物は動脈硬化、心筋梗塞および老化現象との間に深い関わりが有ることが指摘されている。従って、リン脂質過酸化物を破壊する血漿の抗酸化力を測定できることは、このような疾病に至る素因を事前に診断することを可能にするものである。

【0030】

【発明の効果】以上詳述したように、本発明によれば、試料が有しているトータルな抗酸化力を測定できる方法と、この方法を容易に実施できる装置を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、本発明の位置実施例になる抗酸化力測定装置における、過酸化脂質を測定するための検出部の構成を示すブロック図である。

【図2】図2は、図1の検出部に用いられるフローセル9の一例を示す説明図である。

【図3】図3は、図1の検出部に用いられるフローセル9の他の例を示す説明図である。

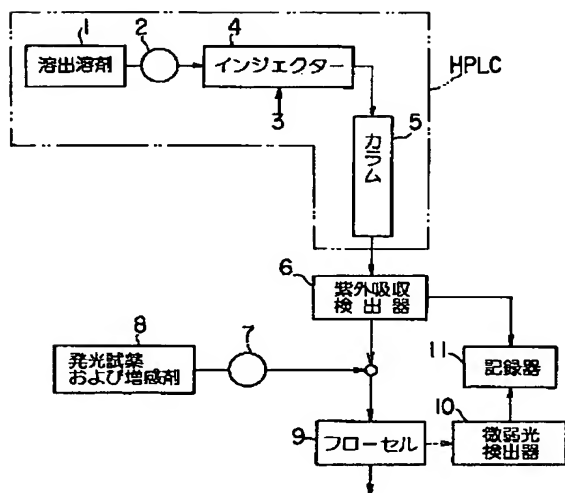
【図4】図4は、図1の検出部を組み込んだ本発明の一実施例になる抗酸化力測定装置の構成を示すブロック図である。

【図5】図5は、図4の装置を用いて血漿サンプルの抗酸化力を測定した結果を示すグラフである。

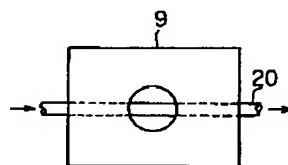
【符号の説明】

1…溶出溶剤、2…液送用ポンプ、3…試料、4…インジェクター、5…カラム、6…紫外線吸収検出器、7…液送ポンプ、8…発光試薬および増感剤、9…フローセル、10…微弱光検出器、11…記録器、20…チューブ、31…混合部、32…検出部、33…データ処理部。

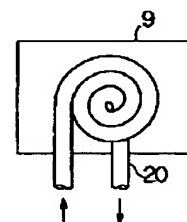
【図1】



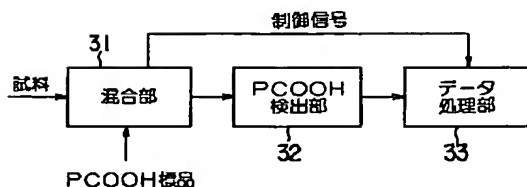
【図2】



【図3】



【図4】



【図5】

